昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, July 2007, 50(7): 737 - 744 ISSN 0454-6296

# 蜂毒溶血肽作用机理研究进展

赵亚华,刘霭珊,李日清,高向阳,张 微,郑慧平
(华南农业大学生命科学学院,广州 510642)

摘要:该文系统归纳了蜂毒溶血肽的生物学功能,分子结构与性质,溶解血细胞的机理,以及溶血和抑菌活性与结构的关系,并结合本实验室研究着重综述了近年来国内外对蜂毒溶血肽作用机理的研究。提出今后研究应该向定量化方向发展,应用计算技术深入阐明蜂毒肽作用的动力学过程及结构与功能的关系,为今后指导分子设计打下一定的理论基础。

关键词:蜂毒溶血肽;生物活性;分子结构;构效关系;作用机理
中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:0454-6296(2007)07-0737-08

## Progress in biological mechanism of melittin

ZHAO Ya-Hua, LIU Ai-Shan, LI Ri-Qing, GAO Xiang-Yang, ZHANG Wei, ZHENG Hui-Ping (College of Life Sciences, South Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract**: We summarized progress in melittin, including the biological function, the molecular structure and characteristics, the mechanism of hemolysis and the relationship between the structure and the activity of hemolysis and antimicrobial of melittin. Meanwhile, based on the related research in our laboratory, we focused on the studies of the mechanism of melittin home and abroad in recent years. We proposed that the study on melittin should be quantified, and the calculation technology should be utilized for further illustrating the dynamical process of melittin and the relationship between structure and function, which may provide a firm theoretical basis for guiding molecular designing in future.

**Key words**: Melittin; bioactivity; molecular structure; structure-activity relationship; action mechanism

自从 1972 年 Habermanm 等发现并从西方蜜蜂 *Apis mellifera* 毒液中分离得到蜂毒肽以来,许多学者对其进行了广泛而深入的研究(Bramwell *et al*., 2003;李朝和黄培堂,2004;王关林和邢卓,2005)。由于蜂毒溶血肽的药用功能强大,是不可多得的天然生物活性物质,且结构特殊,引起了国内外许多学者的关注。目前,已经成为一种研究抗微生物多肽结构与功能的模式肽。作者结合本研究室已有的研究结果(赵亚华等,2005),对蜂毒肽性质和生物学功能以及与生物膜作用的结构互变关系、溶解红细胞和抑菌作用机理、结构与功能关系等方面的研究进展进行较系统的综述。

## 1 蜂毒溶血肽的生物活性及其应用

蜂毒肽是目前人类已知最强的抗菌消炎活性物质之一,它能结合到天然的或人工合成的细胞膜上,裂解各种类型的细胞和脂质体。蜂毒肽强烈抑制 20 余种革兰氏阳性及阴性病原微生物的生长,抗炎活性是近氢化可的松的 100 倍之多,同时具有类激素样的作用,但无激素的不良反应;镇痛强度是吗啡的 40%,且镇痛持续时间较长,但无水杨酸类药物对消化道的刺激和甾体类药物的免疫抑制作用;对前列腺素合成酶的抑制作用是吲哚镁辛的 70 倍;同时还具有治疗关节炎、抗肿瘤和心血管疾病、抗电离辐射以及免疫调节的功能;通过抑制 HIV-Ⅰ LTR 的调节作用而抑制细胞内 Gag 抗原结构蛋白和 mRNA 合成,抑制病毒复制,ID 值在 0.9~1.5 μmol/L 之间;能改变受 HIV 感染的 T 淋巴细胞功能,抑制 HIV 复制,抵抗病毒的感染力,并能以计量依赖方式减少持续感染人类Ⅰ型免疫缺陷病毒的 T 淋巴瘤细胞 HIV-Ⅰ的量;对肿瘤细胞如淋巴瘤和肉瘤等具有

基金项目:国家自然科学基金项目(30570036);山东省教育厅科技计划重点项目(J06I04)
作者简介:赵亚华,女,1955 年生,浙江宁波人,博士,教授,主要从事生物工程、生物药物作用机理方面的研究,E-mail: zhaoyahua@126.com
收稿日期 Received: 2006-11-28; 接受日期 Accepted: 2007-04-30

强烈的细胞毒素作用(Wachinger *et al*.,1998;李朝和黄培堂,2004)。由于蜂毒肽分子小,比起其他一些毒素蛋白如蓖麻毒蛋白、白喉毒蛋白等较大分子毒蛋白来说,免疫原性低,不易产生过敏反应。而在同样情况下对正常细胞的毒性较低,可较大剂量的使用,在胞外就显示对肿瘤细胞毒性,这一性质使其适合于制备抗毒素,治疗癌症。

蜂毒肽能作用于多种细胞内蛋白及酶类而影响细胞代谢功能。例如,与细胞内钙调蛋白有很高的亲合力,影响 $Ca^{2+}$ 转导(Ekaterina *et al*.,2004);通过提高肌浆 $Ca^{2+}$ 水平而诱导骨骼肌收缩,可能的作用机制:(1)使膜去极化,通过兴奋-收缩偶联过程间接提高 $Ca^{2+}$,并允许细胞外 $Ca^{2+}$ 沿化学梯度进入胞内;(2)直接作用于二氢吡啶受体激活兴奋-收缩偶联;(3)直接刺激 $Ca^{2+}$ 释放或阻塞 $Ca^{2+}$ 吸收;(4)激活信号传导(如 PLC)过程(Raynor *et al*.,1991;Brokx *et al*.,2001)。蜂毒肽能激活细胞脂酶,使细胞大量释放其产物而代谢异常(Koumanov *et al*.,2003),本实验室有关研究结果也证明了这一点。蜂毒肽能抑制蛋白激酶 C 和腺苷酸环化酶,诱导神经酰胺合成及使细胞凋亡,影响酪氨酸蛋白激酶,激活 NF$\mu$B 信号转导途径(Knowles and Farndale,1988);对离体心脏有不可逆的麻痹作用,而对麻醉动物可增加灌流阻力,增加低血压水平,增加脉压差,治疗心脏病。农业上蜂毒肽主要应用于家畜疾病治疗和植保,抵御多种病原微生物侵染,抗细菌和真菌,毒杀害虫。如对果蝇属幼虫的 $LD_{50}$ 为 129 $\mu$g/g、烟草天蛾为 15 $\mu$g/g,对美洲棉铃虫和亚洲玉米螟等也有强毒杀作用,及强烈抑制烟草花叶病毒(TMV)的复制。

## 2 蜂毒溶血肽的分子结构及其与性质的关系

蜂毒肽是一种典型的阳离子多肽(cationic antimicrobial peptide,CAP),由 26 个氨基酸残基组成,分子量为 2 840 D,一级结构序列:GIGAV LKVLTTGLPALISWIKRKRQQ。由序列可见,从 N 端起,前 20 个氨基酸残基主要为疏水性,有 2 个正电荷氨基酸,C 端有 4 个正电荷氨基酸,为亲水性。整个分子带 6 个正电荷,分子中 3 个 K 和 2 个 R 残基使蜂毒肽成为带净正电荷的碱性肽。二级结构主要为两亲性(amphiphilic)$\alpha$-螺旋。在 1~20 位氨基酸组成的 $\alpha$-螺旋中,一侧分布 10 个强非极性氨基酸,另一侧分布 4 个极性氨基酸、4 个弱非极性氨基酸和其他一些中性氨基酸。这种两亲性结构是与膜结合和膜蛋白跨膜螺旋的典型特征(Terwilliger and Eisenberg,1982)。在水溶液中蜂毒肽一般以单体和四聚体形式存在,无稳定的二聚体。每个单体结构分 4 个区域,即,(1~10)N 端 $\alpha$-螺旋结构,(11~12)是以 120°角连接 2 个螺旋的绞链结构,(13~20)是 $\alpha$-螺旋结构,(21~26)C 端是正电荷区域。其分子中的两个正电中心在蜂毒肽与膜相互作用中起重要作用。而 K-21 和 R-24 之间存在电荷间相互作用力,W-19 与 R-22 之间存在极性-非极性相互作用,这些作用力都有助于稳定 C 端螺旋结构(Liu and Hu,2003)。

在蜂毒肽四聚体分子中,四条单体的疏水面向里,包围成一个中心疏水区域,亲水面则向外。单体之间相互接触的部位几乎全部为疏水区域,当 4 个单体聚集后,各条多肽链的疏水作用力和各个氨基酸侧基相互的电荷排斥力形成新的平衡(隋森芳,2003;Liu and Hu,2003)。

蜂毒肽在溶液中的存在形式随盐离子浓度,多肽浓度改变而发生结构互变(韩学海和隋森芳,1996)。在纯水中多肽聚集形式随其浓度而变化。光散射发现,在肽浓度为 10 $\mu$mol/L 时开始聚集,浓度达 50 $\mu$mol/L 时聚集成四聚体程度达到最大值(Subbalakshmi *et al*.,1999)。四聚体多肽在纯水中是一个自组装-瓦解的动态过程。组装成四聚体时形成直径 0.55 nm 的内孔道,孔道内疏水环境驱赶水分子而使内部去湿化(dewetting)。整个过程只需 300~400 ps,去湿过程又迫使四聚体瓦解,单体上 I-2、I-17 和 I-20 三个残基对去湿过程起关键作用,被置换成疏水性更低的残基时,影响去湿作用(Liu *et al*.,2005)。

本实验室曾采用 CD 谱研究证实,蜂毒肽在低离子强度溶液中的 $\alpha$-螺旋度很低,几乎无规则的二级结构,而在高 pH 和高盐离子浓度下,其螺旋度上升并强烈倾向于形成 $\alpha$-螺旋的四聚体。这与 Zhao 和 Liu(2006)的结果一致。李顺子等(2005)用 CD 光谱测定蜂毒肽及其类似物在 Tris 缓冲液、含 2 mol/L NaCl 的 Tris 缓冲液和质量分数为 10% 的六氟异丙醇水溶液中的二级结构结果表明,蜂毒肽在 Tris 缓冲液中无确定的二级结构。在含 2 mol/L NaCl 的 Tris 缓冲液中的螺旋结构含量增加,表明其形成聚集体。在 10% HFIP 溶液(模拟生物膜环境)中的螺旋量大增加表明多肽有内在形成螺旋结构的倾向。比较结构与抗菌和溶血活性的关系发现,细

菌细胞膜促进螺旋形成的环境比红细胞膜和 HFIP 水溶液强，而红细胞膜和 HFIP 水溶液的环境类似。

在甲醇溶液中，蜂毒肽倾向于以单体 α-螺旋形式存在，随着浓度增大，螺旋度上升。根据醇的碳原子个数、羟基个数和卤代基团的个数及种类的不同，其诱导蜂毒肽形成 α-螺旋的倾向也不同，但蜂毒肽最终形成 α-螺旋的状态不受以上因素影响。根据 CD 光谱研究，醇诱导蜂毒肽形成螺旋的能力与其烃基长度成正比，与羟基个数成反比，与卤素原子个数成正比，卤素原子影响力大小依次为 F < Cl < Br (Hirota *et al*.，1998)。这一结果与分子动力学模型计算的结果一致，同时还计算出当温度升高时，肽的螺旋度下降，而使螺旋度下降到 50% 时的温度与醇烃基长度呈线性关系(Zhao and Liu，2006)。醇诱导 α-螺旋形成的原因是由于醇的存在降低了溶剂极性，在低极性环境中醇的疏水基团和蜂毒肽上的疏水基团相互作用，减少了肽与水分子的接触，降低了形成分子间氢键的几率，增加了肽自身形成分子内氢键的可能(Knowles and Farndale，1988；Liu *et al*.，2005)。醇分子在水溶液中倾向于形成微团结构，以减少与水分子的接触面，这种微团结构有可能增大醇分子疏水部位与肽的接触面，对于一些特殊的卤代醇如六氟异丙醇，这个作用尤其明显(Hirota *et al*.，1998)。蜂毒肽在醇溶液中随醇分子中碳原子个数增加其螺旋度增加。运用动力学方法能够计算出蜂毒肽分子的能量最小化模型，将此模型的数据作为初始值，模拟肽处于水或不同溶液中时随时间变化而发生着一定的构象变化(Zhao and Liu，2006)。

蜂毒肽 N 端螺旋的稳定性比 C 端的稳定性低，这与氨基酸侧链间电荷相互作用相关，有报道说当 R 与 K 相隔 4 个位置并处于螺旋同侧时，电荷间相互作用最强。蜂毒肽 C 端螺旋中有 4 个带正电氨基酸，而 N 端螺旋只有一个。这种电荷间相互作用在疏水环境或低电介系数介质中会加强。因此，在蜂毒肽结构中加入带电荷氨基酸并将其置于低电介介质中能加强螺旋稳定性(Hirota *et al*.，1998)。有两种描述蜂毒肽在醇溶液中单体与四聚体间结构互变的模型。一种是“两相互变模型”(two-state model)，认为醇诱导 α-螺旋形成过程为 U(unfolded state)→H (helical state)，根据该过程能推导出一系列动力学方程，其理论值与实验数据符合，但当醇浓度升到高浓度( > 15 mol/L)时则出现明显偏差。第二种为螺旋-卷曲互变模型(helix-coil transition model)，认为在无规则卷曲状态和螺旋状态的互变中，存在螺旋中间态。蜂毒肽无规则卷曲单体(U)可自发折叠成 α-螺旋态(H)，也可通过疏水侧链与醇的相互作用(Ualc)再折叠成与醇结合的 α-螺旋态(Halc)，而 H 态的疏水面也可与醇分子因疏水作用而结合转化成 Halc 态，也可由 4 个 H 态单体自聚集成四聚体(H4)(Liu *et al*.，2005)。对在不同 NaCl 浓度下改变离子强度，研究多肽的内源荧光谱发现，随 NaCl 浓度增加，荧光谱峰位和半峰宽变化显示由单体向四聚体的转化曲线呈典型的 S 型。说明多肽由单体向四聚体转变时虽然结构发生了很大变化，但过程不存在均匀的中间态，如稳定的单体螺旋或二体螺旋，自聚集过程只对应无规卷曲的单体和螺旋构象之间的平衡移动，且这一点是浓度依赖的(Gerig，2004)。

## 3 蜂毒溶血肽与生物膜的相互作用关系

蜂毒溶血肽具有裂解细胞膜的活性，能直接作用于细胞磷脂膜使之裂解，从而抑制细胞生长发育。在低 pH 和低离子强度(⩽0.01 μmol/L)水溶液中，蜂毒肽以无规则卷曲的单体存在，不利于膜上离子通道的形成，虽能插膜，但对肿瘤细胞的毒害作用较弱。但在高浓度(⩾10 μmol/L)时能以四聚体形式存在，比单体更有效地与细胞膜结合形成离子通道，且单体数量越多，通过碰撞而聚集形成四聚体的机会越大，当浓度达到 50 μmol/L 时，形成的四聚体最多(韩学海和隋森芳，1996；武轶和隋森芳，1996；Renata *et al*.，2007)。离子通道的形成改变了膜的通透性，使细胞膜破裂。体外实验证明，这种四聚体形式能显著的杀伤肿瘤细胞。

膜脂的种类对蜂毒肽的作用有重要影响(Vogel and Jahnig，2000；Pott and Maillet，2001)。鞘磷脂(SM)在电中性脂双层膜上能促进蜂毒肽的插膜穿孔，但它并不增强蜂毒肽在单层膜上的穿孔。有研究表明，蜂毒肽在 POPC(磷脂酰胆固醇)/SM(1∶1)膜上穿孔比在纯 POPC 膜或 POPC/POPG(磷脂酰甘油)(1∶1)膜上穿孔所需的肽浓度低 10 ~ 30 倍。当 SM 存在于膜上时，膜脂侧链的横向震动加剧，加速了膜从有序固相向无序液相的转变，这种转变促进了蜂毒肽在膜上聚集成孔。天然细胞膜上鞘磷脂的存在能调节蜂毒肽形成的孔洞大小。而在含有胆固醇的 POPC/SM(1∶1)膜上，胆固醇也可诱导膜脂侧链的横向震动，加速膜从有序液相向无序液相转变，该现象不影响裂解单个脂囊所需的蜂毒肽数目，但却增大

了肽与膜结合的可逆性(Gomara *et al*.,2003)。有研究认为,蜂毒肽与膜结合的速率远大于与膜分离的速率,因此认为,一定程度上蜂毒肽与膜的结合是不可逆的。胆固醇的存在加大了这种可逆性,因而使蜂毒肽的作用下降(Rex *et al*.,2002)。胆固醇具有电负性,而蜂毒肽中具有正电荷中心,两者之间可能由于电场力的作用使肽锚定在膜表面而阻止分子进一步插膜(Constantinescu and Lafleur,2004)。

利用溴原子萃灭技术和 CD 光谱技术,研究蜂毒肽在不同膜脂成分的脂质体中插入和折叠时发现,蜂毒肽折叠成 α-螺旋与其插入膜的过程紧密偶联。在胆固醇/POPC,POPG/POPC 和纯 POPC 膜中,蜂毒肽 Trp-19 进入膜的时间明显早于肽折叠成螺旋的时间。而蜂毒肽折叠的速度受膜脂种类的影响,在 POPG/POPC 膜上的插入速度快于纯 POPC 膜,而在胆固醇/POPC 膜中这一插入速率最慢。这可能是由于膜脂的化学成分不同,肽插入时的动力学过程差异所致(Ladokhin and White,1999;Vogel and Jahnig,2000)。当蜂毒肽逐渐插入到膜中时,其之前在水相中与水分子形成的氢键断裂,并随之在其分子内部的各个氨基酸之间形成分子内氢键,从而形成螺旋结构,而且,分子中两段螺旋形成的时间也有先后,先形成 1~10 位的 N 端螺旋,继而形成 13~20 位的中间螺旋。形成螺旋后,极性残基和疏水残基分布在螺旋两侧,由于大的疏水面暴露在极性溶剂中不稳定,故多肽一旦形成螺旋便相互聚集形成稳定的四聚体(Pott and Maillet,2001)。

与电中性的膜相比,蜂毒肽能更快更深入地与电负性膜结合,表明膜表面电荷密度是调节蜂毒肽插膜的一个重要因素(Constantinescu and Lafleur,2004)。CD 光谱研究结果表明,蜂毒肽在 POPC 膜上能形成定向的跨膜结构,但在带阴离子的 POPG 膜上却不能,这是因为膜表面的电负性抑制了蜂毒肽在膜上的分子运动(Wilcox *et al*.,1992)。作者认为,膜脂表面一定量的负电荷能与蜂毒肽正电荷相互产生静电作用,但如果负电荷数过高,则在膜上锚定了蜂毒肽,限制了后者在膜脂上的进一步折叠,降低其形成定向的跨膜结构,而并非是限制了蜂毒肽的移动。同时,利用表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)技术制作的细胞膜表面模型芯片探测在 DMPC(电中性)和 DMPG(电负性)膜上多肽结合情况时也发现,多肽与 DMPG 膜结合程度比 DMPC 大。

蜂毒肽在生物膜/模型膜上形成穿孔的机制,主要是通过 LSIMS 质谱技术(隋森芳,2003)、发射电子显微镜(Park *et al*.,2006)、导向 CD 光谱(Yang *et al*.,2001;Huang,2006)、X-射线衍射(McIntosh,2004)、中子散射(Allende *et al*.,2005)等研究手段测试获得的。得到较多支持的是"环形穿孔模型"。该模型认为,蜂毒肽与膜之间存在一个肽/脂浓度比的临界值$(P/L)^*$,当 $P/L<(P/L)^*$ 时,蜂毒肽首先通过静电作用与膜脂极性头部结合,在膜表面形成裂缝,使膜表面扩张,迫使膜脂发生形变而填补裂缝,此时的肽分子在膜上未形成穿孔,多肽的螺旋与膜表面平行。肽与膜的结合致使膜变薄,其程度与 P/L 成正比。当肽进一步与膜结合,$P/L>(P/L)^*$ 时,膜形态发生突变,所有与膜表面结合的肽插入到膜中,螺旋与膜表面垂直,在膜上形成穿孔;此时肽的极性面与膜脂的极性头相结合,疏水面倾斜向外形成疏水孔洞,相邻的肽不相接触,上下两层膜脂向内卷曲组成孔洞壁。模型认为,多肽的极性段与膜脂头部的结合缓解了膜脂弯曲的压力,在此时多肽作用更大程度上是稳定孔洞结构(Constantinescu and Lafleur,2004)。根据对"环形穿孔模型"的动力学分析认为,脂的碳链所占面积(Alc)和膜区域可压缩系数(Ka)是这个模型中的关键系数。Alc 下降,膜与多肽结合时有更少的碳链暴露在多肽表面,而使疏水作用力下降,而 Ka 关系到改变脂分子形态所需的能量,由于膜表面在多肽结合时必须延展开,所以 Ka 增大,所需能量也增大。因此由具有较大 Alc 和 Ka 值的脂(如胆固醇,脂多糖)组成的膜不易被裂解。膜脂的单层膜自发曲率(R0)对裂解率也有影响。单层膜更易自发弯曲成一定的曲率,显然,具有正曲率的脂更容易弯曲成环形孔洞,而负曲率的脂不易(Huang,2006)。

普遍认为,蜂毒肽的溶血作用主要基于穿孔机制(Blondelle and Houghten,1991;Pérez-Payá *et al*.,1994;Ladokhin and White,2001;Zelezetsky and Tossi,2006)。本实验室通过对蜂毒肽作用于血细胞的电镜观察发现,蜂毒肽能诱导膜渗透,天然纯化的蜂毒肽浓度在 1 μg/mL 时即对鸡红细胞发生溶血,浓度达到 7 μg/mL 时完全溶血;扫描电镜观察到蜂毒肽作用后的红细胞膜干瘪、表面褶皱、变形,细胞变形性降低,菌体表面粗糙甚至破损;透射电镜观察到胞质分布不均匀且有收缩破损迹象,而核质部分变化则不明显;利用荧光化学法结合激光共聚焦显微镜动态观察 FITC 标记的蜂毒肽能迅速包围红细胞,使细胞呈现一个个暗黑的圆盘状,且肽在圆盘边缘

结合的密度较大。随作用时间延长，细胞边缘结合 FITC 肽的膜碎片脱落，细胞亮度逐渐与周围环境一致，细胞表面从圆盘边缘部位开始出现破损、裂解，并逐渐向细胞中间部分发展，直至细胞形成一堆残骸。根据作用时间发现，荧光标记的多肽加入红细胞的前 10 min，在激光共聚焦显微镜下观察到多肽尚未作用于红细胞，而在 10 min 后两者发生强烈作用，整个过程 10 min 内完成。这一结果与前人结论和' 环形穿孔模型 '现象吻合，有力地支持了这一模型。

有研究认为，蜂毒肽除直接在生物膜上形成孔洞使膜裂解造成溶血外，还可通过激活红细胞膜上的磷脂酶而降解膜脂。多肽可根据其与膜脂浓度的比例，抑制或激活 PLA2 活性。低浓度的蜂毒肽抑制 PLA2，但当浓度 $\geqslant 1\ \mu$mol/L 时，则激活 PLA2。通过在人血清中蜂毒肽降解大肠杆菌释放脂肪酸的实验发现，血清中存在一种对热和胰岛素敏感的因子，这种因子对蜂毒肽激活磷脂酶的过程有促进作用，同时也可激活磷脂酶 D（Blondelle and Houghten，1991）。本实验室关于蜂毒肽对红细胞膜研究也表明，蜂毒肽不能降解制备的膜脂。结合蜂毒肽诱导膜渗透现象认为，对完整的红细胞这两种过程同时并存，但蜂毒肽引发膜结构混乱是主要作用，而激活磷脂酶降解膜脂是次要作用。

本实验室先前还验证了蜂毒肽与红细胞作用后，细胞膜蛋白中 Band-2 蛋白的一个亚型被裂解，Band-3 蛋白被降解为两个碎片，在 Band-4 蛋白附近产生两条新带，对照标准蛋白分子量可知，这两条区带分子量在 45 kD 左右，推测是 Band-3 蛋白降解的两个片段。Band-3 蛋白是红细胞膜上含量最多的跨膜糖蛋白，其 C 端为伸向膜外侧的带负电糖肽链，跨膜区是折叠 14 次的富含 α-螺旋结构，在膜上构成亲水离子通道，且通过变构作用转运离子（Liu and Hu，2003）。Band-3 蛋白 C 端糖肽链的高粘度特性可作为膜保护剂，防护蛋白水解酶对膜上蛋白的水解及防治病毒和细菌等的侵害，同时兼具细胞识别功能（Kanki *et al*.，2002）。Band-3 被降解后，红细胞阴离子通道破坏，同时蜂毒肽阻止了 Band-3 所对应的刀豆球蛋白 A 结合部位，阻止葡萄糖及阴离子转运，使红细胞膜微环境破坏，膜正常功能受阻。由于膜保护剂被破坏，肽分子间接激活了膜上或环境中的蛋白酶，并与 Band-2 结合，使磷酸化作用和 $Ca^{2+}$-ATP 酶活性受到抑制，且影响 Band-2 蛋白的膜收缩作用和膜骨架功能（Blaskó and Schagina，1996），从而影响整个膜的正常功能。本实验室研究还发现，蜂毒肽处理后的血液孵育渗透脆性下降，并能抑制或破坏红细胞膜上的 $Na^+$-$K^+$-ATP 酶，使细胞内 $K^+$ 渗漏到胞外，细胞渗透压改变，离子转运失衡。经蜂毒肽处理的红细胞，其 G-6-PD 活性也丧失，使细胞的糖代谢异常，造成最终的细胞破裂。单细胞凝胶电泳表明蜂毒肽并不作用于 DNA，进一步说明蜂毒肽与红细胞作用的部位主要是细胞膜（Oren and Shai，1997）。

细菌细胞膜上的脂质 A 带有多个磷酸基负电荷，蜂毒肽中富含碱性带正电荷，两者间正负电荷的吸引，对革兰氏阴性菌产生抑杀作用。蜂毒肽对部分革兰氏阳性菌也具有抑杀活性。地毯机制是占主导地位的模型（Shai and Oren，2001）。多肽在溶液中呈自由卷曲态（F-form），在一定盐离子浓度下，卷曲成螺旋态（A-form），同时具有某些特殊结构的多肽趋向于与其周围的分子相互作用，结合成 S-form。处于 A-form 和 F-form 的多肽都可与带负电的膜表面相互作用，与膜平行地结合到膜上（M-form），疏水侧面朝向磷脂膜而亲水侧面朝向溶液分子，此时，由于通气管效应（snorkel effect）的作用，多肽进入膜中，插入的深度由多肽疏水部分和极性部分的特性决定。插膜后，产生与去垢剂相似的作用，使膜胶囊化，最终使膜结构瓦解。在这种模式下，蜂毒肽无需形成结构性的穿孔通道。以这种机制抑杀细菌，其肽链上分布有一定量的正电荷，而与哺乳动物等两亲性的细胞膜只呈现微弱的结合力或根本不结合，故不裂解血细胞造成溶血。通过对膜结合蜂毒肽的特异性蛋白酶降解产物的 LSIMS 分析蜂毒肽在膜上" 抛锚 "状态，也有力证明了该模型的正确性（韩学海和隋森芳，1995；隋森芳，2003）。结果显示，膜结合的多肽同样受到蛋白酶攻击，只是水解速度与游离肽有差异，表明肽并未垂直插入膜内，而是以平躺的螺旋方式锚定于膜上，螺旋中含 K-7，K-21，R-22 一侧朝向膜外。认为毒素蛋白的插膜过程分为吸附和插入两步，肽分子先通过静电作用被吸附到膜上，在膜诱导下结构转变为有利于插膜的构象最终裂解膜。

本实验室通过透射电镜观察蜂毒肽对大肠埃希氏菌和金黄葡萄球菌发现，多肽首先通过静电与细胞外膜结合，使菌体表面形成突起，进而与内膜作用扰乱膜脂排列，改变膜透性使胞内物质扩散并向胞外渗漏，紫外吸收值升高，影响了细菌的代谢系统，最终膜局部破损，引起细菌解体。这一结果与之前

关于地毯机制的描述一致。综合以上说明,蜂毒肽的抗菌机理与通过阻断细菌的大分子生物合成发挥作用的传统抗生素机理不同,这是细菌对抗菌蛋白不易产生耐药性的重要原因之一。然而,蜂毒肽是否通过通道进入细胞内,进一步影响细胞的信号传导系统和基因的表达?对此还需进行深入研究。

## 4 蜂毒溶血肽结构与功能的关系

通过对蜂毒肽氨基酸进行逐个删除,观察残余多肽的抗菌性及溶血性变化发现:除 P-14 外,删除组成 α-螺旋的任一氨基酸(1~9,13~20)都明显降低溶血性,删除组成'铰链'及 C 端结构域的氨基酸对溶血活影响不大,而删去任一疏水性氨基酸对溶血活都有重大影响。删去 6~9,15~20 及 13 位氨基酸可使溶血性下降 75%~90%。K-21,23 删除后还有 94%和 99%的溶血性,但 K-7 删除后溶血性下降了 74%。C 端氨基酸单独删除后溶血性有所升高(10 μg/mL),说明 C 端氨基酸并非单独地对溶血性产生影响。另外,N 端的 α-螺旋长度较短时,蜂毒肽溶血性也会降低。铰链区的作用是连接两个 α-螺旋,对溶血作用基本无影响。21~26 位正电荷区域是多肽与膜结合的重要部位。两亲性螺旋对溶血性是必要的,而对抗菌作用则非如此,Oren 和 Shai(1997)在研究蜂毒肽的非对映异构体及反式对映体中证实,非对映异构体蜂毒肽螺旋度很低,不具有溶血性,但有抗菌作用。对删除单个氨基酸的蜂毒肽类似物的研究发现,无论是化学修饰或是以 L 取代,都使其活性大大下降,C 端氨基酸对溶血性没有影响,W-19 在蜂毒肽活性中有重要作用(李顺子等,2005)。综上所述,归纳有溶血性蜂毒肽的结构特征可能是:(1)具有两亲性 α-螺旋结构;(2)α-螺旋必须有一定长度使其能够插膜;(3)L-6、9、13、16、K-7、V-8、I-17、20、W-19 对溶血性影响很大,它们即保证了螺旋长度,同时也保持了足够的亲疏水性,以及为多肽提供正电荷。

对于抗菌活性,单独删除蜂毒肽中的任一氨基酸对其影响不大,但删除 G-12 使抗金黄色葡萄球菌的活性升高 2 倍,而删除任一 L 都会使抗菌性明显下降,说明抗菌活性与氨基酸序列的关系没有溶血性那样紧密(Sun *et al*.,2005)。对蜂毒肽 C 端 15 个氨基酸组成的多肽及类似物的研究发现其溶血性比蜂毒肽小 300 倍,抗菌活性小 5~7 倍。对多肽进行适当改造,增大其疏水力矩后,溶血性比原多肽升高 3 倍,抗菌活性则与蜂毒肽相当(Gerig,2004)。通过对一系列 α-螺旋抗菌肽的结构与抗菌活性关系比较后发现:(1)增加螺旋中的正电荷有利于提高抗菌性,且这种提高与多肽正电荷的整体数量相关,而与具体正电荷在多肽中的分布位置无关;(2)抗菌活性与多肽是否形成 α-螺旋没有大的相关性,形成螺旋趋势下降对溶血活性的影响比抗菌活性大;(3)在螺旋度和电荷数不变前提下,降低多肽的平均疏水度会使抗菌性大大下降,疏水度在诱导多肽进入膜的过程中有重要影响,同时氨基酸侧面碳链的长度对肽插入膜中的深度也有影响(刘利梅等,2003)。本实验室对蜂毒肽突变表达的结果也验证了以上观点。通过将 V-5 替换成 R,A-15 替换成 R,同时删除 L-16,降低多肽螺旋度的同时增加了正电荷数,发现溶血活性下降了 14 倍而抗菌性基本不变(赵亚华等,2005)。

## 5 结语

对蜂毒素的研究,国外对其结构和机理研究较多,国内的研究主要着重在蜂毒肽基因表达和药学价值等方面,对其结构和作用机理研究较少。近年来有学者以其作为模式肽研究与膜相互作用的机理。由于研究手段发展很快,从传统荧光染料渗漏实验、CD 光谱、荧光萃灭实验发展到 SPR 芯片技术、SFG 振动光谱、导向 CD 光谱、X 射线衍射、光学二次谐波光谱、固态核磁共振和中子散射等,这些新技术的应用极大地促进了对蛋白质及肽分子研究的进展。而分子动力学计算方法的应用更成为其向定量化方向迈进的有力工具。展望未来,对蜂毒素的研究应该向定量化方向发展,应用计算机技术深入阐明蜂毒肽作用的动力学过程,以及阐明各种理化因素对其与膜作用的影响,为今后更进一步深入研究这类抗菌肽结构与功能的关系,指导分子设计打下坚实的理论基础。

## 参 考 文 献 (References)

Allende D, Simon SA, McIntosh TJ, 2005. Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: evidence for toroidal pores. *Biophys. J.*, 88(3): 1 828-1 837.

Blaskó K, Schagina LV, 1996. Tracer kinetic studies of melittin action on RBC membranes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 40(1): 9-13.

Blondelle SE, Houghten RA, 1991. Hemolytic and antimicrobial activities of the twenty-four individual omission analogues of melittin. *Biochemistry*,

30：4 671 – 4 678.

Bramwell VW，Somavarapu S，Outschoorn I，Alpar HO，2003. Adjuvant action of melittin following intranasal immunisation with tetanus and diphtheria toxoids. *Journal of Drug Targeting*，11（8 – 11）：525 – 530.

Brokx RD，Lopez MM，Vogel HJ，Makhatadze JI，2001. Energetics of target peptide binding by calmodulin reveals different modes of binding. *J. Biol. Chem.*，276（17）：14 083 – 14 091.

Constantinescu I，Lafleur M，2004. Influence of the lipid composition on the kinetics of concerted insertion and folding of melittin in bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*，1 667：26 – 37.

Ekaterina AS，Nataliya VD，Alexander MR，Kenneth BS，Olga DL，2004. Melittin induces both time-dependent aggregation and inhibition of Na，K-ATPase from duck salt glands however these two processes appear to occur independently. *Biochim. Biophys. Acta*，1 661：188 – 195.

Gerig JT，2004. Structure and solvation of melittin in 1，1，1，3，3，3-hexafluoro-2-propanol/water. *Biophys. J.*，86（5）：3 166 – 3175.

Gomara MJ，Nir S，Nieva JL，2003. Effects of sphingomyelin on melittin pore formation. *Biochim. Biophys. Acta*，1 612：83 – 89.

Han XH，Sui SF，1995. Study on intermediate state in the process of melittin self-association by fluorescence spectra. *Acta Biophysica Sinica*，11（4）：475 – 480.［韩学海，隋森芳，1995. 蜂毒素自聚集过程中间态的荧光光谱研究. 生物物理学报，11（4）：475 – 480］

Han XH，Sui SF，1996. The self-association of melittin at low concentration in aqueous solution. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*，28（3）：307 – 311.［韩学海，隋森芳，1996. 低浓度蜂毒素在溶液中的自聚集. 生物化学与生物物理学学报，28（3）：307 – 311］

Hirota N，Mizuno K，Goto Y，1998. Group additive contributions to the alcohol-induced α-helix formation of melittin：implication for the mechanism of the alcohol effects on proteins. *J. Mol. Biol.*，275：365 – 378.

Huang HW，2006. Molecular mechanism of antimicrobial peptides：the origin of cooperativity. *Biochim. Biophys. Acta（BBA）-Biomembranes*，1 758（9）：1 292 – 1 302.

Kanki T，Sakaguchi M，Kitamura A，Sato T，Mihara K，Hamasaki N，2002. The tenth membrane region of band 3 is initially exposed to the luminal side of the endoplasmic reticulum and then integrated into a partially folded band 3 intermediate. *Biochemistry*，41（47）：13 973 – 13 981.

Knowles BH，Farndale RW，1988. Activation of insect cell adenylate cyclase by *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins and melittin. Toxicity is independent of cyclic AMP. *Biochem. J.*，253（1）：235 – 241.

Koumanov K，Momchilova A，Wolf C，2003. Bimodal regulatory effect of melittin and phospholipase A2-activating protein on human type Ⅱ secretory phospholipase A2. *Cell Biol. Int.*，27（10）：871 – 877.

Ladokhin AS，White SH，1999. Folding of amphipathic α-helices on membranes：energetics of helix formation by melittin. *J. Mol. Biol.*，285：1 363 – 1 369.

Ladokhin AS，White SH，2001.‘Detergent-like’permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochim. Biophys. Acta*，1 514：253 – 260.

Li C，Huang PT，2004. A new generation of antibiotic：The advance on investigation of antimicrobial peptides. *World Notes on Antibiotics*，25（3）：109 – 112.［李朝，黄培堂，2004. 新一代抗生素：抗菌肽相关研究进展. 国外医药：抗生素分册，25（3）：109 – 112］

Li SZ，Sun XJ，Yan HS，He BL，2005. Antimicrobial and hemolytic activities of melittin and its analogue and their interactions with phospholipid membranes. *Chemical Journal of Chinese Universities*，26（1）：73 – 77.［李顺子，孙学军，阎虎生，何炳林，2005. 蜂毒肽及其类似物的抗菌活性、溶血活性及与磷脂膜的作用. 高等学校化学学报，26（1）：73 – 77］

Liu HL，Hu CM，2003. The effects of solvent and temperature on the structural integrity of monomeric melittin by molecular dynamics simulations. *Chemical Physics Letters*，375：119 – 125.

Liu LM，Fu GH，Wang TY，Jiang XM，Guo ZW，Shi CN，2003. The effect of Lys892 – Phe895 of C-terminal domain on the aniotransport of band3 transmembrane domain. *Prog. Biochem. Biophys.*，30（2）：1 – 5.［刘利梅，傅国辉，王天英，姜晓姝，郭卓维，史从宁，2003. 人类红细胞膜带 3 蛋白 C 端域 Lys892 ~ Phe895 在 Cl-转运过程中作用的研究. 生物化学与生物物理进展，30（2）：1 – 5］

Liu P，Huang XH，Zhou RH，Berne BJ，2005. Observation of a dewetting transition in the collapse of the melittin tetramer. *Nature*，437：159 – 162.

McIntosh TJ，2004. The 2004 Biophysical Society-Avanti Award in Lipids address：roles of bilayer structure and elastic properties in peptide localization in membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*，130（2）：83 – 98.

Oren Z，Shai Y，1997. Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin：structure-function study. *Biochemistry*，36（7）：1 826 – 1 835.

Park SC，Kim JY，Shin SO，Jeong CY，Kim MH，Shin SY，Cheong GW，Park Y，Hahm KS，2006. Investigation of toroidal pore and oligomerization by melittin using transmission electron microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*，343：222 – 228.

Pérez-Payá E，Houghten RA，Blondelle SE，1994. Determination of the secondary structure of selected melittin analogues with different haemolytic activities. *Biochem. J.*，299：587 – 591.

Pott T，Maillet JC，2001. The lipid charge density at the bilayer surface modulates the effects of melittin on membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*，109：209 – 223.

Raynor RL，Zheng B，Kuo JF，1991. Membrane interactions of amphiphilic polypeptides mastoparan，mellitin，polymyxin B，and cardiotoxin. Differential inhibition of protein kinase C，$Ca^{2+}$/calmodulin dependent protein kinase Ⅱ and synaptosomal membrane $Na^+$，$K^+$-ATPase，and $Na^+$ pump and differentiation of HL60 cells. *J. Biol. Chem.*，266（5）：2 753 – 2 758.

Renata MS，Terra JA，Guimaraes HV，2007. Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*，25：767 – 772.

Rex S，Bian J，Silvius JR，Lafleur M，2002. The presence of PEG-lipids in liposomes does not reduce melittin binding but decreases melittin-induced leakage. *Biochim. Biophys. Acta*，1 558：211 – 221.

Shai Y，Oren Z，2001. From“carpet”mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides*，22（10）：1 629 – 1 641.

Subbalakshmi C, Nagaraj R, Sitaram N, 1999. Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity. *FEBS Letters*, 448: 62 – 66.

Sui SF, 2003. Membrane Molecular Biology. Beijing: Higher Education Press. 460 – 461. [**隋森芳**, 2003. **膜分子生物学. 北京: 高等教育出版社**. 460 – 461]

Sun XJ, Chen SX, Li SZ, Yan HS, Fan YG, Mi HF, 2005. Deletion of two C-terminal Gln residues of 12 – 26-residue fragment of melittin improves its antimicrobial activity. *Peptides*, 26: 369 – 375.

Terwilliger CT, Eisenberg D, 1982. The structure of melittin. *The Journal of Biological Chemistry*, 257: 6 016 – 6 022.

Vogel H, Jahnig F, 2000. The structure of melittin in membranes. *Biophysical Journal*, 50: 573 – 582.

Wachinger M, Kleinschmidt A, Winder D, 1998. Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *J. Gen. Virol.*, 79(4): 731 – 740.

Wang GL, Xing Z, 2005. Current status and prospect of melittin study. *Journal of Liaoning Normal University* (*Natural Science Edition*), 28 (1): 87 – 91. [**王关林, 邢卓**, 2005. **蜂毒肽的研究与展望. 辽宁师范大学学报(自然科学版)**, 28(1): 87 – 91]

Wilcox W, Eisenberg D, 1992. Thermo dynamics of melittin tetramerization determined by circular dichroism and implications for protein folding. *Protein Sci.*, 1(5): 641 – 653.

Wu Y, Sui SF, 1996. Interaction of colicin El with lipid membranes. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 28 (4): 346 – 351. [**武轶, 隋森芳**, 1996. **毒素蛋白** colicin E1 **与磷脂膜相互作用. 生物化学与生物物理学学报**, 28(4): 346 – 351]

Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW, 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophysical Journal*, 81: 1 475 – 1 485.

Zelezetsky I, Tossi A, 2006. Alpha-helical antimicrobial peptides: Using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochim. Biophys. Acta* (*BBA*)-*Biomembranes*, 1 758(9): 1 436 – 1 449.

Zhao JH, Liu HL, 2006. The effects of various alcohols on the secondary structural integrity of melittin, TH-10Aox, and Tc1 by molecular dynamics simulations. *Chemical Physics Letters*, 420: 235 – 240.

Zhao YH, Dong JN, Cui H, Bai Y, Jin KH, Jiang ZY, 2005. Design, synthesis and expression in *Pichia pastoris* of melittin. *China Biotechnology*, 25(2): 45 – 48. [**赵亚华, 董竟南, 崔红, 白云, 金科华, 蒋智勇**, 2005. **蜂毒素分子的改造及其基因在毕赤酵母中的表达. 中国生物工程杂志**, 25(2): 45 – 48]


**(责任编辑: 黄玲巧)**